

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Versuche mit m-, o- und p-Nitro-E 600

von

Helmuth Nirschl

aus

Schwabach



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Versuche mit m-, o- und p-Nitro-E 600

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



vorgelegt

von

Helmuth Nirschl

aus

Schwabach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher von Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1972

I. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist eine Darstellung der Geschichte der deutschen Literatur von der Mitte des 18. Jahrhunderts bis zur Gegenwart. Sie ist in drei Teile gegliedert: I. Die Aufklärung, II. Die Romantik, III. Die Moderne. Jeder Teil ist in Kapitel unterteilt, die die wichtigsten Autoren und Werke behandeln.

Die Aufklärung ist die Zeit der Vernunft und der Freiheit. Sie ist die Zeit der großen Denker, die die Grundlagen der modernen Welt geschaffen haben.

Meinen lieben Eltern gewidmet

Die Romantik ist die Zeit der Empfindung und der Natur. Sie ist die Zeit der großen Dichter, die die Seele der Nationen ergriffen haben.

- 1. Die Aufklärung
- 2. Die Romantik
- 3. Die Moderne
- 4. Die Literatur der Gegenwart
- 5. Die Literatur der Zukunft
- 6. Die Literatur der Vergangenheit
- 7. Die Literatur der Welt
- 8. Die Literatur der Menschheit

Die Moderne ist die Zeit der Wissenschaft und der Technik. Sie ist die Zeit der großen Erfinder, die die Welt verändert haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
II. Problemstellung	15
III. Eigene Untersuchungen	16
IV. Ergebnisse und statistische Auswertung	20
V. Diskussion und Zusammenfassung	22
VI. Literaturverzeichnis	25

I. EINLEITUNG

Seit vielen Jahren spielen die von Schrader in den vierziger Jahren entdeckten Phosphorsäureester in der Schädlingsbekämpfung eine tragende Rolle. Zu dieser Gruppe gehören auch O,O-Dimethyl-O-(o-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer 46673), O,O-Dimethyl-O-(m-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer 46294) und O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer E 600).

Die vermehrte Anwendung von organischen Phosphorinsektiziden bewirkte eine zunehmende Alkylphosphat-Resistenz bei Insekten. Als fundamentale Ursache für eine Resistenz sind physiologisch-chemische Vorgänge im Organismus anzusehen. Toxische Verbindungen können entgiftet werden durch (Jarczyk 1966):

- a) Oxydation
- b) Reduktion
- c) Dehalogenierung und Dehydrohalogenierung
- d) Hydrolyse
- e) Konjugation
- f) Reaktion mit Schwefelverbindungen

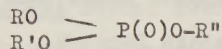
Jarczyk (1965) befaßte sich mit der enzymatischen Entgiftung organischer Phosphorinsektizide der E 605-Reihe im

Insekt. Als Versuchstiere dienten ihm Raupen mehrerer Lepidopteren-Arten. Organo-Phosphate abbauende Enzyme wurden bisher bei Insekten auch in Küchenschaben (O'Brien 1957; Plapp und Casida 1958), Mücken (Matsumura und Brown 1961 und 1963), Reiskeuschrecken (Kojima und Ishizuka 1960), Spinnmilben (Matsumura und Voss 1965) und in Stubenfliegen (Krüger und Casida 1961, Openoorth und van Asperen 1961) beschrieben.

Die Gewinnung der Enzyme gelang ihm aus den Mitteldarmabschnitten der Lepidopteren-Raupen nach sorgfältiger Sektion der Därme und Homogenisation durch mehrstündige Zentrifugation bei 38000 g x Min und nachfolgender mehrfacher Chromatographie an Sephadex G 100 Säulen, womit er eine Trennung der Alkylphosphate angreifenden Hydrolasen von den Phosphatasen erreichte.

Für die Beziehung enzymatischer Abbaurate "in vitro" und chemischer Struktur der E 600 Homologe erstellt er folgende Tabelle (Tabelle 1):

Tabelle 1: Die Beziehung zwischen enzymatischer Abbaurrate "in vitro" und chemischer Struktur der E 600 Homologe



R	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
R'	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃
R''	p-	o-	m-
$K = n \cdot 10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$			
Rohgemisch	1,62	35,8	13,8
P=O	1,47	30,5	13,1
P=S	1,89	5,84	9,98
Umsatz / $\mu\text{Mol/mg}$ Total N / 60 min			
Rohgemisch	0,09	1,81	0,74
P=O	1,5	24,9	12,4
P=S	1,8	5,4	8,8

Der Umsatz bei meta und - ortho Methyl-E 600 ist also besser als bei Paraoxon, und zwar in der Reihenfolge:

o > m > p bei P = O Enzym

m > o > p bei P = S Enzym

In den Mitteldärmen der Lepidopteren-Raupen finden sich 2 Organophosphat-Insektizide abbauende Hydrolasen, die

sich hinsichtlich ihrer Umsatzzahlen, Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und ihrer Substratspezifität voneinander unterscheiden. Beide Fermente haben ihre optimale Aktivität im schwach alkalischen Bereich.

Aufgrund seiner Untersuchungen schlägt Jarczyk zur Klassifizierung dieser Hydrolasen entsprechend der Internationalen Union für Biochemie die Schaffung einer neuen Gruppe bei den Hydrolasen vor. Der Schwerpunkt bei der Beurteilung sollte auf die Spaltung von Phosphorsäureestern ganz allgemein und nicht auf die Hydrolyse von Phenol-Estern (Gruppe 3.1.1.2 Arylester Hydrolasen) gelegt werden. Es sollten dann bezeichnet werden:

- 3.1.7 Phosphorsäuretriester Hydrolasen
- 3.1.7.1 Orthophosphat dialkylarylester
 Nitrophenol-Hydrolase
- 3.1.7.2 Orthothionophosphat dialkylaryl-
 ester Nitrophenol-Hydrolase

Über die Frage, welches Enzym bzw. welche Enzyme verantwortlich sind für die Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, sind von verschiedenen Seiten umfangreiche Untersuchungen vorgenommen worden. Vornehmlich wurden hierbei Serumfraktionen als Enzymquellen verwendet. Da jedoch die gleichen Serumenzyme u.U. fähig sind, Ester zu spalten, die keinen Phosphor enthalten, ließ sich

weniger über ihre Spezifität und Eigenschaften sagen als etwa bei den Gewebeenzymen (Koelle 1963).

Mazur und Bodanski fanden 1946, daß sich im Plasma und in den Geweben vom Kaninchen und Menschen ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, welches sich nicht mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur zu einem extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Ester-Bindung, jedoch im entscheidendem Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten. Mazur und Bodanski (1946b) konnten das verantwortliche Enzym 30-fach konzentrieren (unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität) und gaben ihm den Namen "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (Grob und Mitarb. 1947).

Aldridge (1953a) teilte die Serumesterasen von Kaninchen, Pferd und Ratte nach ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in eine A-Esterase und B-Esterase ein. Jene Esterase, welche durch E 600 nicht inaktiviert wurde, nannte er A-Esterase (Aryl- oder Aromatic-Esterase). In einer weiteren Arbeit fand Aldridge (1953b) ein E 600-hydrolysierendes Enzym, genannt E 600-Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente bezüglich der Eigenschaften dieses Enzyms feststellte, daß sie identisch ist mit der schon bekannten A-Esterase, aber nicht mit der sauren und alkalischen Serumphosphatase. Innerhalb der einzelnen

Tiergattungen schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten, was seiner Meinung nach auf die Proteinunterschiede zurückzuführen ist.

Unter den fünf bestehenden Phenol-Ester-hydrolysierenden Esterasen (erythrocyte-acetocholinesterase, plasma-butrylcholinesterase, erythrocyte-aliesterase, erythrocyte-aromacicesterase, plasma-aromatic-esterase) des menschlichen Blutes scheinen nach Mounter und Whittaker (1953) die erythrocyte-aromatic-esterase und die plasma-aromatic-esterase, wenn nicht identisch, so doch extrem ähnlich zu sein. Nach jenen Autoren sind zudem beide wahrscheinlich identisch mit der von Aldridge (1953a; 1953b) gefundenen A-Esterase.

Die ausgedehnten Untersuchungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen von Augustinsson und Heimbürger (1954a; 1954b; 1954c; 1954d; 1954e; 1955a; 1955b; 1957) beschäftigten sich an erster Stelle mit Tabun, welches durch ein Enzym hydrolysiert wird, einstweilen als "tabunase" bezeichnet. Es ist jedoch nicht spezifisch für Tabun, und so führten die Autoren eine allgemeine Bezeichnung für organische Phosphorverbindungen-hydrolysierende Enzyme ein, nämlich "Phosphorylphosphatase". Letztere und die Cholinesterase konnten sie in Cohn'schen Fraktionen aus dem

menschlichen Serum von anderen Esterasen trennen (Fraktion IV-1: Tabunase; Fraktion IV-6: Cholinesterase) (Augustinsson und Heimbürger 1954b). Es wurde ferner vermutet, daß Tabun und DFP (Diisopropylfluorophosphat) vom selben Enzym hydrolysiert werden.

Tabun wird bei der hydrolytischen Spaltung an der P-CN-Bindung getrennt. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte üben einen schwach-hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus (etwa 15 % des ursprünglichen Tabun wird in der enzymatischen Hydrolyse nicht angegriffen (Augustinsson 1954c).

In einer weiteren Arbeit untersuchten Augustinsson und Heimbürger (1954a) die Spezifität jener Phosphorylphosphatase (=Tabunase). Ihre Ergebnisse zeigten, daß von ihr (isoliert innerhalb der Fraktion IV-1) sowohl Tabun, DFP wie Mintacol = E 600 hydrolysiert wird, E 600 jedoch noch durch "andere" Enzyme gespalten werden kann. Unter anderem stellten sie hierbei fest, daß Chlorthion nicht angegriffen wird. In vergleichenden Experimenten zwischen Tabun und Mintacol zeigte Augustinsson und Mitarb. (1954e), daß (speziell im Kaninchenblut) zwei Enzyme vorhanden sind, wobei jedes Enzym jedes Substrat spaltet, und daß das Enzym, welches Mintacol spaltet, von Aldridge A-Esterase genannt, nicht iden-

tisch ist mit der Tabunase. Augustinsson vermutet deshalb, daß E 600 sowohl durch jene Aldridge'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, beide wahrscheinlich anwesend in der Cohn'schen Fraktion IV-1.

1960 versuchte dann Main das Paraoxon-hydrolysierende Enzym aus dem Schafs-Serum möglichst rein darzustellen. Durch eine 330 - 385-fache Reinigung resultierte ein elektrophoretisch ermitteltes 80 - 95 %ig reines Enzympräparat. Main stellte bei der gereinigten Fraktion eine Zunahme (0,29 mM auf 4,2 mM) der Michaelis-Konstante fest, was er auf "Paraoxonase"-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein scheinen. Außerdem ermittelte er das Molekulargewicht der Paraoxonase mit 35 000 - 50 000.

Bei in vitro Versuchen mit den Seren weißer Mäuse untersuchten Schaumann und Schiller (1960) die Inaktivierung von Cholinesterase-Hemmern. Hierbei gingen sie davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind: Eine Absorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und außerdem stark adsorbiert. DFP jedoch wird weder abgebaut noch adsorbiert.

1961 gelang es dann Erdös und Boggs, die Vermutung frühe-

rer Arbeiten zu bekräftigen, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei nicht die Gesamtaktivität des Nativserums erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600-spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin (Fraktion V), welche durch Aluminon (Aurintricarbonsäure) völlig auszuschalten war. Bei Mischung der Fraktion IV-1 und V waren die Ergebnisse mit den selektiven Inhibitoren ähnlich dem normalen Serum.

In der gleichen Richtung liefen die Untersuchungen von Skrinjaric-Spoljar und Mitarb. (1968) mit menschlichem Serum. Als Substrat verwendeten sie Paraoxon und Armin, und es zeigte sich, daß für beide Substrate sowohl in der Fraktion IV-1, als auch in der Fraktion V eine Aktivität bestand. In der erstgenannten war die Aktivität für beide Substanzen höher als in der zweiten. In der Fraktion IV-1 erwies sich die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität größer als die Armin-hydrolysierende. In der Fraktion V war genau das Gegenteil zu beobachten.

Ihre Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon (und für Armin)

im menschlichen Serum existiert. Nativseren aber enthalten nach Meinung von Skrinjaric-Spoljar und Mitarb. wahrscheinlich noch ein Enzym mit ausgesprochener "Paraoxonase"-Aktivität, da in der Mehrzahl der Seren Paraoxon schneller hydrolysiert wurde als Armin, wohingegen eine Mischung von Fraktion IV-1 und Fraktion V eine größere "Arminase"- als "Paraoxonase"-Aktivität hervorbrachte.

Krisch (1968) unterscheidet hinsichtlich der E 600-spaltenden Aktivität des Serums beim Menschen zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen. Es ergibt sich daraus die Frage, ob diese Aktivitätsunterschiede auf quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder auf zwei qualitativ verschiedene Enzymproteine zurückzuführen sind. Krisch findet bei den Versuchspersonen mit hohen und niedrigen Aktivitäten gleiche Michaeliskonstanten, wobei es im Einzelfall nicht möglich war, einzelne Personen wegen des großen Überlagerungsbereiches bestimmten Aktivitätsgruppen zuzuordnen. Auch hält er es für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Gruppen genetisch bedingt sind.

Untersuchungen von Burgis (in Vorbereitung) sowie Metzner (in Vorbereitung) zeigen, daß beim Mensch Thiono-Verbindungen im alkalischen Milieu kaum einer fermentativen Spaltung durch menschliche Serumenzyme unterworfen sind.

Das läßt vermuten, daß im Serum kein Enzym vorhanden ist, das die Alkyl-Aryl-Phosphorsäureester an der Anhydridbindung zu spalten vermag, solange auch Schwefel an die Phosphorsäure gebunden ist (Augustinsson 1954d; Burgis). Burgis stellte außerdem fest, daß Paraoxon und Methylparaoxon wahrscheinlich von dem gleichen Enzymsystem hydrolysiert werden (Korrelationskoeffizient = 0,965), und daß eine Substitution der Äthylgruppe durch Methylgruppen keinen Einfluß auf das enzymatische Hydrolyseverhalten der Paraoxonase nimmt.

II. PROBLEMSTELLUNG

In dieser Arbeit soll "in vitro" die enzymatische Hydrolyse von O,O-Dimethyl-O-(o-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer 46673), O,O-Dimethyl-O-(m-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer 46294) und O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-Phosphat (Bayer E 600) durch menschliches Serum untersucht werden. Zur Bestimmung einer eventuellen Abhängigkeit der Enzymaktivität sollen außerdem die Blutgruppen bezüglich des ABO-Systems und Dd bestimmt werden. Die nach dem von Krisch (1968) angegebenen Standardtest gewonnenen Ergebnisse sollen den von Jarczyk (1965) gewonnenen Ergebnissen gegenübergestellt werden, die er in Versuchen mit den aus den Mitteldärmen der Lepidopteren Raupen dargestellten Enzymen erarbeitete. Weiter soll geprüft werden, ob die von Jarczyk vorgeschlagene neue Bezeichnung der Hydro-lasen, ohne Änderung oder Erweiterung für die im menschlichen Serum vorkommenden Enzyme übernommen werden kann.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zu Grunde lag der Standardtest wie er von Krisch (1968) angegeben wurde. Als Enzymquelle wurde das nicht mehr als 24 Stunden alte Serum von 31 gesunden Blutspendern der Blutbank der Universität Erlangen verwendet. Davon waren 3 Personen weiblichen und 28 Personen männlichen Geschlechtes, im Alter von 22 bis 51 Jahren. Das Serum wurde zur Untersuchung 1 : 5 mit 0,9 %iger Na Cl verdünnt.

Von den zu untersuchenden Giften O,O-Diäthyl-O(p-nitrophenyl-)Phosphat (E 600), O,O-Dimethyl-O(o-nitrophenyl-)Phosphat und O,O-Dimethyl-O(m-nitrophenyl)Phosphat wurde je eine Stammlösung angesetzt, bestehend aus 1 ml Trispuffer mit pH 8, 4 ml Aqua dest. und 0,003 ml Gift. Für die Untersuchung wurden in einer auf konstanter Temperatur von 25,5° C gehaltene OS-Küvette (von der Schichtdicke 1 cm) 1,65 ml Glycin-NaOH Puffer mit pH 11,2; 0,25 ml 1 : 5 verdünntes Serum und 0,5 ml Stammlösung pipettiert. Gemessen wurde in einem selbstregistrierenden Spektralphotometer, Modell DK 2 der Firma Beckmann Instruments, bei der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch Hydrolyse freigesetzten Menge an p-Nitrophenol, o-Nitrophenol und m-Nitrophenol. In Abständen von jeweils 30 sec wurde die Extinktion registriert. Zur Auswertung kam die Extinktionsdifferenz des Serumwertes von 120 sec abzüglich

des Extinktionswertes des Leerwertes (E 600 im alkalischen Milieu ohne Serum) über 6 min dividiert durch 3. Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in n-Mol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin NaOH Puffer pH 11,2).

$$405 \text{ nm} = 18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{Mol}^{-1}$$

zugrunde gelegt. 10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten demnach (bei d = 1 cm und 405 nm) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml-Seren durch Multiplikation mit 20) der Messzeit (Umrechnung auf 1 min durch Division durch 2) und des Ansatzvolumens (2,4 ml; Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} &= \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2} \\ &= \Delta E \cdot 1329 \quad (\mu/\text{l Serum}) \end{aligned}$$

Zur Bestimmung einer eventuellen Abhängigkeit der Enzymaktivität wurden außerdem die Blutgruppen bezüglich des ABO-Systems und Dd der 31 Personen bestimmt.

In der folgenden Tabelle sind von den 31 untersuchten Personen Name, Geburtsdatum, Blutgruppe und Rh-Faktor geordnet nach den Enzymaktivitäten (Substrat E 600) aufgeführt.

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt Versuchsnummer, Name, Geb.-Datum, Blutgruppe, Rh-Faktor und Enzymaktivität (Substrat E 600) der 31 untersuchten Personen

Vers. Nr.:	N a m e	Geburts- datum	Blut- gruppe	Aktivität (Substrat E 600)
1	Knecht Werner	12. 2.42	0 pos	31
2	Langenwalder Meinhardt	12. 5.48	0 pos	43
3	Nägel Georg	22. 1.43	0 pos	45
4	Heidrich Reiner	21. 3.49	0 pos	53
5	Dr. Schubert Wolfgang	13. 8.29	0 pos	53
6	Mehling Albert	25. 2.48	0 pos	54
7	Meiler Rudolf	8. 6.44	A ₁ pos	59
8	Bietz Henriette	12. 5.20	A ₁ pos	60
9	Thoms Peter	27. 3.40	B pos	73
10	Weigert Dietrich	24. 6.46	A ₂ pos	80
11	Klement Walter	12. 9.36	0 pos	82
12	Tuffner Martin	16. 5.47	A ₁ pos	98
13	Dr. Zeitner Leonhard	31.12.39	A ₂ neg	98
14	Gravius Albrecht	8. 9.49	0 pos	106

Vers. Nr.:	N a m e	Geburts- datum	Blut- gruppe	Aktivität (Substrat E 600)
15	Eismann Lothar	20.10.50	O pos	108
16	Merklein Bernhard	17. 6.36	B neg	112
17	Merz Reinhold	17. 6.38	B pos	117
18	Harnisch Ingo	2. 8.44	A ₁ pos	134
19	Meyer Heinrich	18. 9.46	O pos	146
20	Kintzel Herbert	9. 7.35	O pos	170
21	Batz Grete	2.10.21	A ₁ pos	225
22	Schuster Veronika	11. 8.48	O pos	225
23	Ackermann Peter	29. 8.30	O pos	266
24	Schalk Fritz	9. 2.29	A ₁ pos	369
25	Sangl Horst	6.12.40	A ₁ pos	381
26	Nöring Ulrich	11. 2.23	O neg	388
27	Hoffereck Werner	30. 6.47	O pos	391
28	Nirschl Helmuth	23. 6.45	O pos	417
29	Spiegel Herbert	5. 7.46	A ₁ B pos	429
30	Fitzner Klaus	15. 7.35	O pos	524
31	Vittinghof Dirk	28. 5.41	A ₁ B pos	730

IV. ERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Im Gegensatz zu den Versuchen von Jarczyk (1965), der für die aus den Mitteldärmen der Lepidopteren-Raupen dargestellten Enzymen für m- und o- E 600 eine höhere Aktivität als für p- E 600 vorfand, stellte sich bei unseren Versuchen heraus, daß im menschlichen Serum mit der angewandten Methode für o- E 600 eine kaum meßbare und statistisch nicht auswertbare Enzymaktivität, und für m- E 600 überhaupt keine Enzym-Aktivität nachzuweisen ist. Die für E 600 gefundenen Werte liegen zwischen 31 und 730 $\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{l}^{-1}$ Serum (siehe Abb. I). Sie lassen sich grob in 3 Gruppen einteilen, in eine niedere von 31 bis 90 μMol , eine mittlere von 90 bis 170 μMol , und eine hohe Gruppe für die Werte darüber (siehe Abb. II).

Bei der statistischen Analyse ergaben sich folgende Parameter für die 3 Gruppen:

	Mittelwert	Standardabweichung
Gr I	57,54	15,74
Gr II	121,00	24,35
Gr III	395,00	143,48

Mit Hilfe der F-Prüfung wurden die Standardabweichungen überprüft, die Mittelwerte wurden mit der t-Prüfung verglichen.

Es ergab sich ein statistisch gesicherter Unterschied (99 %) bei Gruppe II und III, die Werte von Gruppe I und II sind nicht signifikant verschieden.

Bei den 31 untersuchten Personen wurden 17 mal Blutgruppe O (siehe Abb. III), 9 mal Blutgruppe A (siehe Abb. IV), 3 mal Blutgruppe B und 2 mal die Blutgruppe AB festgestellt. Der Rh-Faktor war 28 mal positiv, je 1 mal negativ bei Blutgruppe A₂, B und O (siehe Abb. III + IV).

Aufgrund der angestellten Untersuchungen läßt sich keine Blutgruppenabhängigkeit der niederen, mittleren oder hohen Typen nachweisen. Die Abbildung III läßt eine Häufung der Anzahl der Personen mit Blutgruppe O im Bereich bis zu einer Enzymaktivität von 170 μ Mol erkennen. Dies entspricht jedoch der Normalverteilung der Enzymaktivität. Auch bei der Blutgruppe A (Abb. IV) ist keine Abweichung von der allgemeinen Verteilung erkennbar. Über die Abhängigkeit von den Blutgruppen B und AB, läßt sich keine sichere statistische Aussage machen, da sich nur 3 Personen mit der Blutgruppe B und 2 mit der Blutgruppe AB fanden.

Die Werte für Blutgruppe B lagen bei 73, 112 und 117 Mol, die der Blutgruppe AB bei 428 und 730 μ Mol. Auch für den Rh-Faktor lassen sich bezüglich der Abhängigkeit keine Aussagen machen, da nur 3 Personen Rh-negativ waren und zwar mit den Werten 98, 112 und 388 μ Mol.

V. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der Untersuchung der Hydrolyse von m-, o- und p- E 600 im menschlichen Serum lassen erkennen, daß im Serum Enzyme vorhanden sind, die E 600 zu spalten vermögen, solange die Nitrogruppe in Parastellung steht. Für o- und m- E 600 war keine Enzymaktivität nachzuweisen, was auf die sterische Anordnung des Enzyms zurückzuführen sein dürfte. Nicht gesagt sein soll damit, daß es überhaupt keine Serumenzyme gibt, welche Phosphorsäureester dieser Art hydrolysieren, denn es ist durchaus möglich, daß durch das stark alkalische Milieu unter unseren Versuchsbedingungen spezifische Enzyme gehemmt oder zerstört werden. Über die Enzymstruktur läßt sich aber wahrscheinlich erst dann genaueres aussagen, wenn man die verantwortlichen Enzyme wenigstens annähernd isoliert hat.

Stellen wir nun die Ergebnisse dieser Untersuchungen denen Jarczyk (1965) gegenüber, so zeigt sich im menschlichen Serum ein völlig anderes Enzymverhalten gegen o- und m- E 600 als bei den aus Insektenlarven isolierten Enzymen. Während im menschlichen Serum p- E 600 gut hydrolysiert wird, m- und o- E 600 dagegen überhaupt nicht, zeigt sich bei Lepidopteren, daß o- und m- E 600 besser hydrolysiert werden als p- E 600 und zwar in der Folge $o > m > p$.

Gesucht werden kann der Grund einmal darin, daß es sich hier aus den aus den Mitteldärmen der Lepidopteren-Raupen gewonnenen Enzymen um Gemische handelt, während es sich bei dem im menschlichem Serum vorliegenden Enzym um reine Paraoxonase handelt. Zum anderen wäre es denkbar, daß für die Hydrolyse von o- und m- E 600 in den Mitteldärmen der Lepidopteren ein anderes Enzym verantwortlich ist.

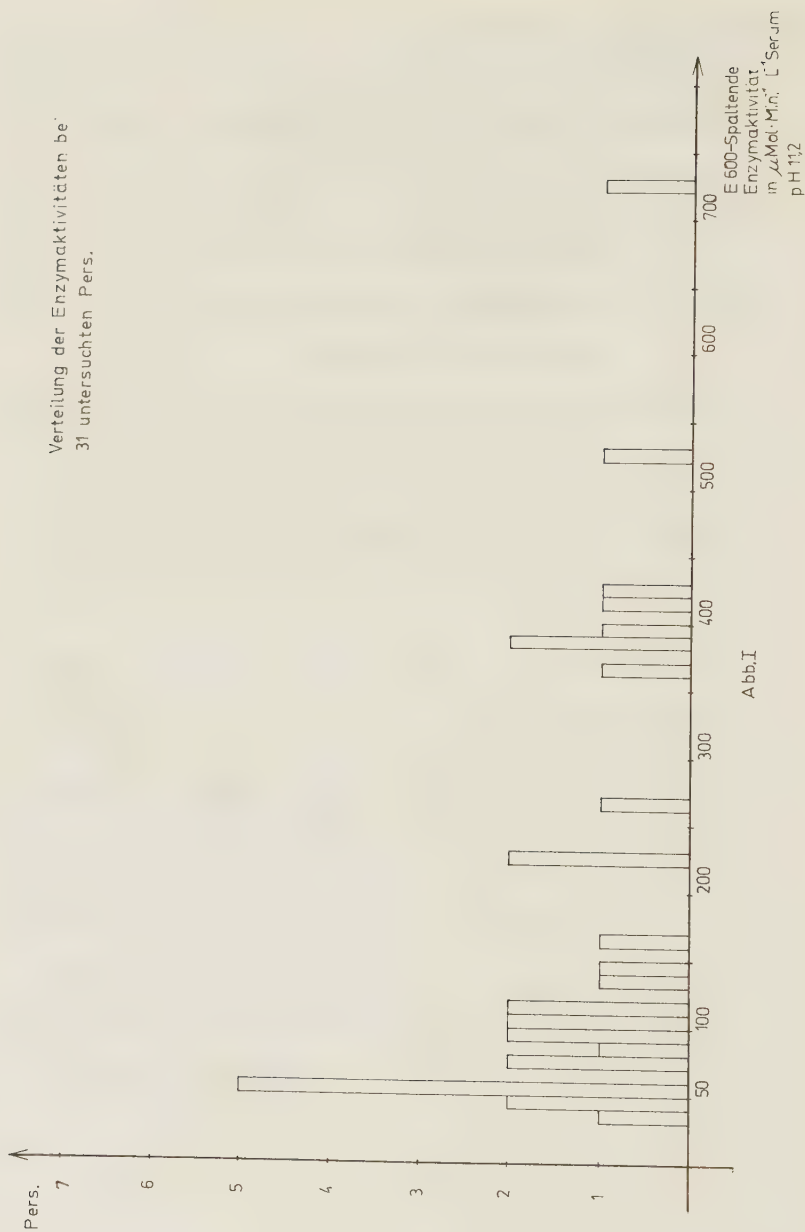
Nicht unwidersprochen soll deshalb Jarczyks Vorschlag zur Klassifizierung dieser Hydrolasen bleiben. Die von ihm aufgrund seiner Untersuchungen an Lepidopteren-Raupen erstellte Klassifizierung kann durch diese am Menschen angestellten Versuche in dieser Form nicht übernommen werden. Die unter der neuen Gruppe 3.1.7.1 von Jarczyk vorgeschlagene Orthophosphat dialkylarylester Nitrophenol Hydrolase gibt es im menschlichen Serum, bedarf aber weiterer Unterteilungen, da dort nicht Nitrophenole allgemein abgespalten werden, sondern das hier gefundene Enzym äußerst substratspezifisch ist, das heißt E 600 wird nur gespalten, solange die Nitrogruppe am Phenolring in Parastellung steht.

Aufgrund unserer Untersuchungen soll deshalb die von Jarczyk (1965) geschaffene neue Gruppe 3.1.7.1 drei Untergruppen erhalten.

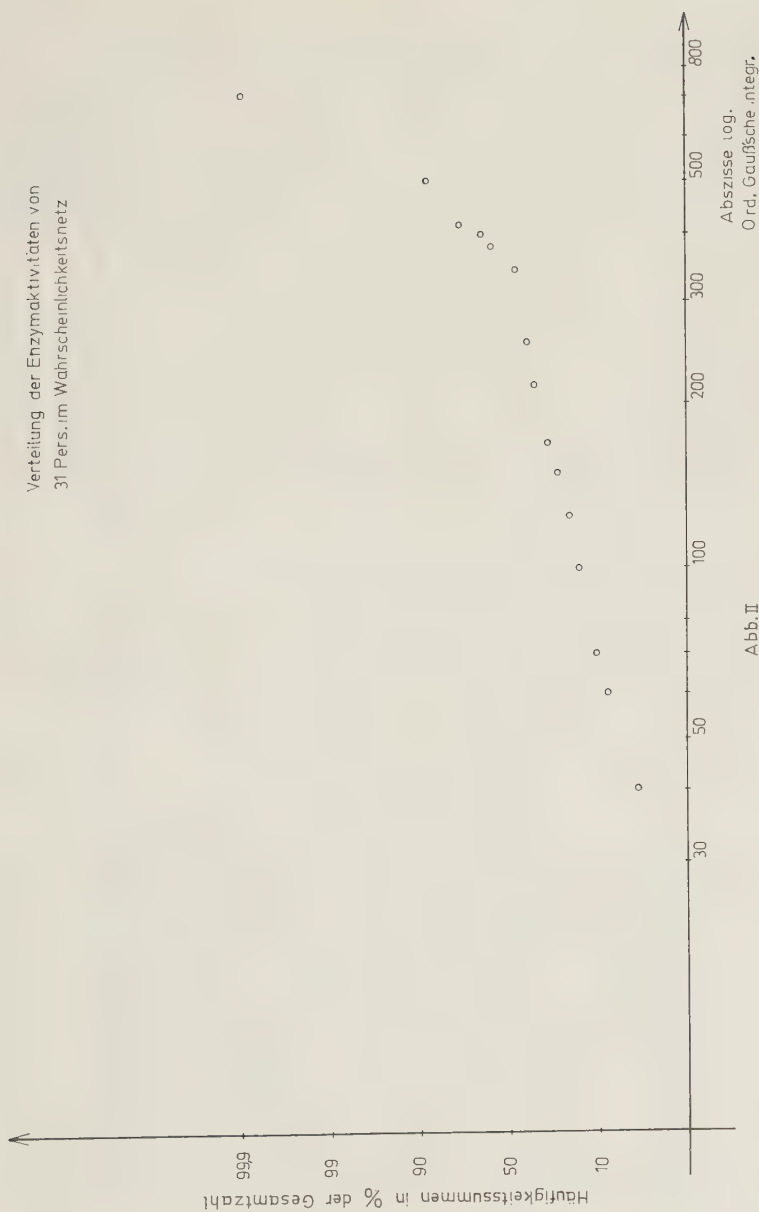
Es wären dann zu bezeichnen:

- 3.1.7.1.1 Orthophosphat dialkylarylester
 p-Nitrophenol-Hydrolase
- 3.1.7.1.2 Orthophosphat dialkylarylester
 o-Nitrophenol-Hydrolase
- 3.1.7.1.3 Orthophosphat dialkylarylester
 m-Nitrophenol-Hydrolase

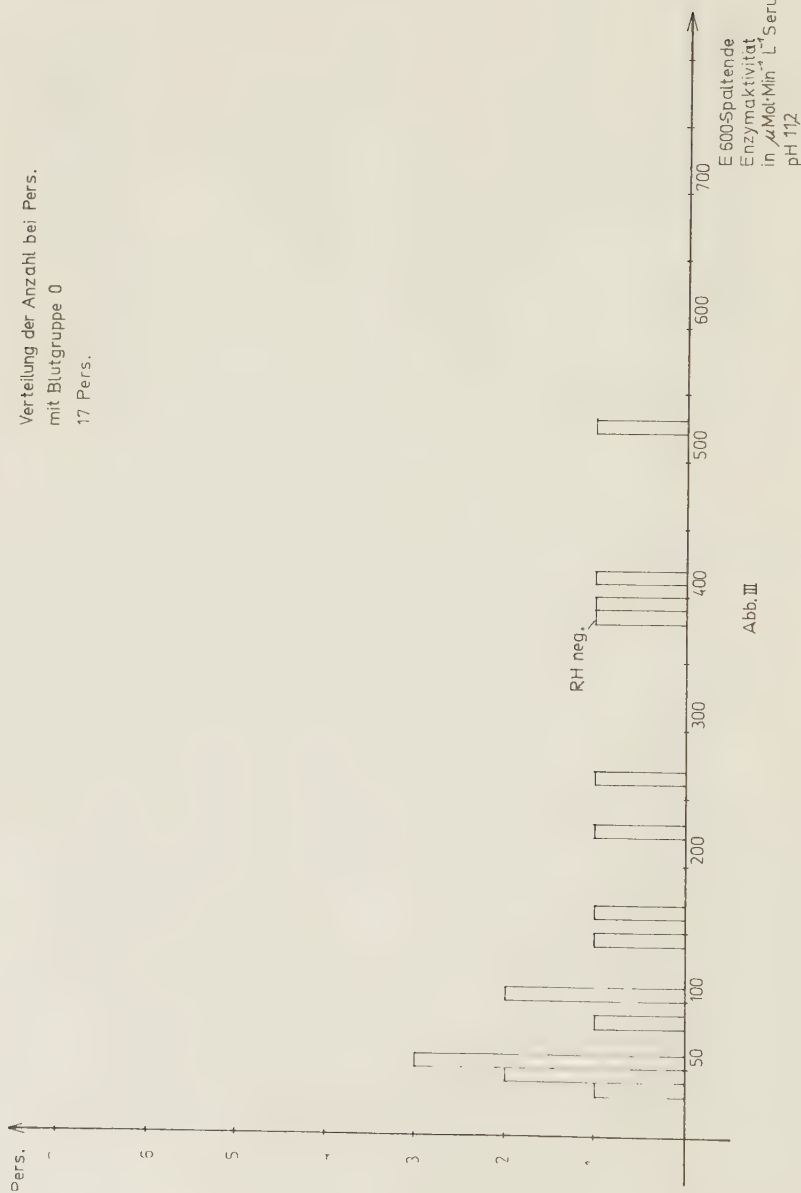
Verteilung der Enzymaktivitäten bei
31 untersuchten Pers.



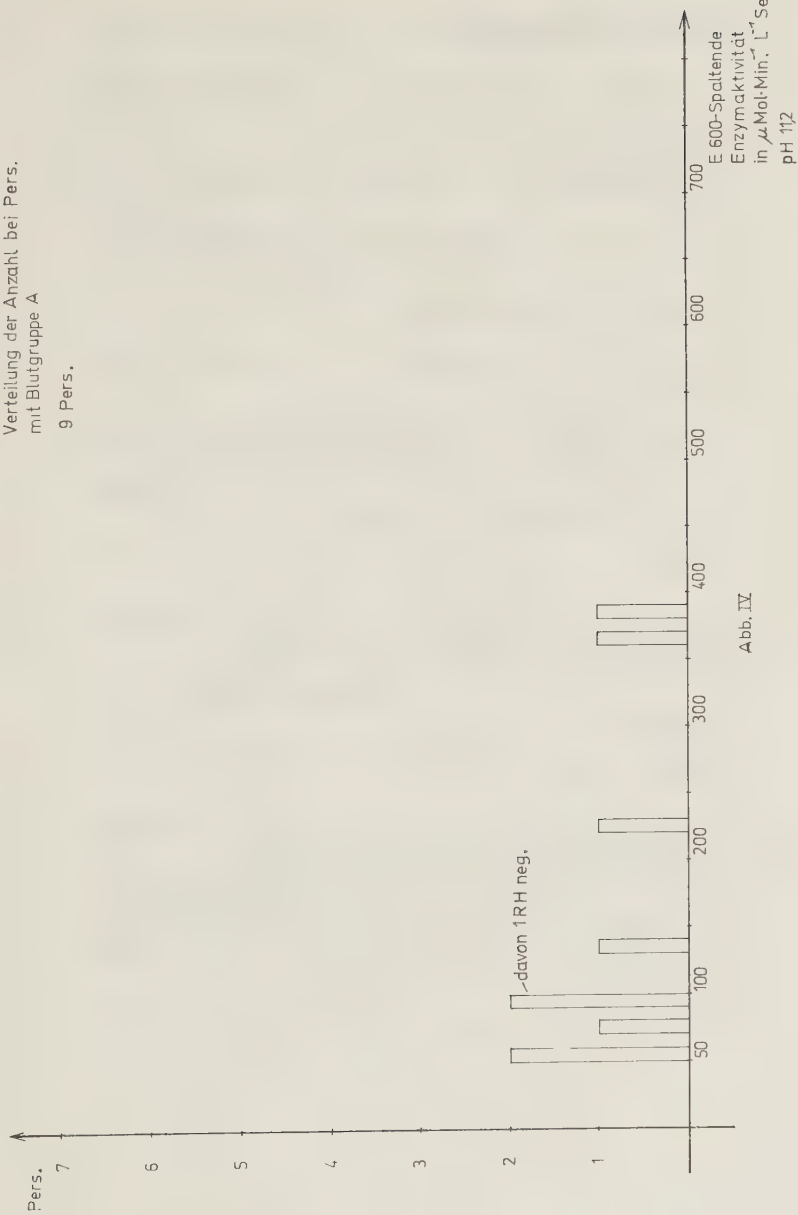
Verteilung der Enzymaktivitäten von
31 Pers. im Wahrscheinlichkeitsnetz



Verteilung der Anzahl bei Pers.
mit Blutgruppe 0
17 Pers.



Verteilung der Anzahl bei Pers.
mit Blutgruppe A
9 Pers.



VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDRIDGE, W. N.

Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetat, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

2. ALDRIDGE, W.N.

Serum Esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

3. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

4. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds

I. Occurence of enzymes hydrolysing dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun).

Acta Chem. Scand 8, 753 (1954 b)

5. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
II. Analysis of reaction products in experiments
with Tabun and some properties of blood plasma
tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)
6. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
III. Effect of cholinesterase inhibition and in-
hibition of cholinesterase in the presence of
tabunase.
Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)
7. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
IV. Specificity studies.
Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)
8. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
V. Effect of phosphorylphosphatase on the inacti-
vation of cholinesterase by organophosphorus com-
pounds in vitro.
Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955 a)

9. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
VI. Effect of metallic ions on the phosphoryl-
phosphatases of human serum and swine kidney.
Acta chem. Scand. 9, 383 (1955 b)
10. AUGUSTINSSON, K.-B. und G. HEIMBÜRGER
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatases.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)
11. BAUMGARTNER, W.
Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen
fermentativem E 600-Abbau und Vergiftung der
Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum.
Dissertation Erlangen (1970)
12. BURGIS, H.
Dissertation Erlangen, in Vorbereitung
13. ERDÖS, E.G. und L.E. BOGGS
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)

14. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin 6.-9.10.1969
15. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-
(p-nitrophenyl)-phosphat.
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
16. GROB, D., LILIENTHAL J.L.Jr., A.M. HARVEY und
B.F. JONES
The administration of di-isopropyl fluorophosphate
(DFP) to man.
I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase;
general systemic effects; use in study of hepatic
function and erythro-poiesis; and some properties
of plasma cholinesterase.
Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)

17. JARCZYK, H.J.

Nachweis und Charakterisierung von Phosphor- und Thionophosphorsäureester der E 605-Reihe spaltenden Hydrolasen aus Mitteldärmen von Lepidopteren Raupen.

Z. Naturforschung 20b, 257 (1965)

18. JARCZYK, H.J.

Der Einfluß von Esterasen in Insekten auf den Abbau von Phosphorsäureestern der E 605-Reihe.

Pflanzenschutznachrichten "Bayer" 19, 1 (1966)

19. KOELLE, G.B.

Cholinesterase and anticholinesterase agents.

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk XV.

Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)

20. KRISCH, K.

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum.

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

21. LA MOTTA, R.V. und Ch.L. WORONICK

Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase.

Clin. Chem. 17, 135 (1971)

22. MAIN, A.R.

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960)

23. MAZUR, A. und O. BODANSKY

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate.
J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

24. MAZUR, A. und O. BODANSKY

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates.
J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)

25. METZNER, H.

Dissertation Erlangen, in Vorbereitung

26. MOUNTER, L.A. und V.P. WHITTAKER

The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases.
Biochem. J. 54, 551 (1953)

27. NEAL, R.A.

Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) in vitro.
Biochem. J. 103, 183 (1967)

28. SCHAUMANN, W. und M. SCHILLER
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und
im Serum.
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)
29. SCHRADER, G.
Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid
aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angewandte Chem. 66, 265 (1954)
30. SCHRADER, G.
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-
Ester.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1963)
31. SKRINJARIC-SPOLJAR, M. und E. REINER
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and
ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.
Biochim. Biophys. Acta 165, 289 (1968)
32. WAGNER-JAUREGG, Th.
Modellreaktionen phosphorhaltiger Enzym-Inakti-
vatoren.
Arzneimittel-Forschung (Aulendorf) 4, 527 (1954)

Herrn Professor Dr.Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

Lebenslauf

Name: : Helmuth Nirschl

geboren am : 23. Juni 1945

in : Schwabach

Staatsangehörigkeit : deutsch

Namen der Eltern : Dr. med. Alois Nirschl, Chirurg
Elisabeth Nirschl, geb. Wiest

Schulbildung : 1951-1955 Volksschule in Schwabach
1955-1965 Oberschule, Humanistischer
Zweig der Adam-Kraft ORS Schwabach

Studiengang : WS 1965/66 Studium der Naturwissen-
schaften an der Universität München
SS 1966-SS 1971 Studium der Zahn-
medizin an der Universität Erlan-
gen-Nürnberg

Prüfungen : Abitur im Juni 1965
Vorphysikum März 1967
Physikum im März 1969
Zahnmed. Staatsexamen:
im Oktober 1971

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990